

MTA doktori értekezés bírálata

Nagy Bálint: A valósídejű PCR módszer alkalmazása a klinikai genetikai gyakorlatban

Az alkalmazott kutatások végső célja, hogy eredményeit a gyakorlatban is alkalmazzák, amit nem mindig könnyű elérni, hiszen sokszor a hagyományos, jól bevált, megismert módszereket kell lecserélni egy ismeretlenre. Nagy Bálint kutatásai jó példák erre a folyamatra, hiszen követve a mai tudományos világunk talán leggyorsabban fejlődő ágát, a molekuláris biológiát, az elmúlt években több olyan módszert honosított meg munkahelyén, amelyek alkalmazzák ennek a területnek a vívmányait. MTA doktori értekezésében részben ezeket a kutatásokat ismerteti, részben egyes beállított módszerekkel alapkutatás jellegű kérdéseket vizsgál.

Formai értékelés

A dolgozat formai szempontból megfelel a doktori értekezéssel szemben támasztott követelményeknek, összesen 146 oldalon minden szükséges fejezet megtalálható benne, kezdve a rövidítések jegyzékétől a köszönetnyilvánításig. Nyelvezete, stílusa tudományos, de könnyen, jól olvasható. Helyesírási, fogalmazási pontatlanságok nagyon ritkák. Az egy-két, általam felfedezett hiba felsorolásától eltekintek. A jelölt tudományos cikkeinek, idézettségének száma bőven meghaladja a doktori címmel kapcsolatos alapkövetelményeket.

Szakmai értékelés

A dolgozat érdemi része egy történelmi áttekintéssel kezdődik, ami számomra egy kicsit tankönyvjellegű, de ez nem jelent feltétlenül hibát, főleg azért nem, mert a kutatások fő célja éppen ezeknek a módszereknek a bevezetése a klinikai gyakorlatba. A módszerleírásoknál a hibridizációs (FRET) próba leírásával volt egy kis problémám. Én úgy tudom, illetve utánanézve az internet is azt mutatta, hogy ezeknél a próbáknál a detektálás az annealing (hibridizáció) közben kell, hogy történjen, hiszen akkor kerül egymás közelébe a donor és az akceptor. Ezzel szemben a dolgozatban az található, hogy a detektálás a lánchosszabbítás végén történik. Ez valóban így van?

A következő kérdés a 28. oldalon leírt génexpresszió mérésnél merült fel bennem, ahol a pontos koncentráció meghatározáshoz ismert DNS tartalmú hígítási sor készítését javasolja béta globin génből. Mivel a génexpresszió mérés mRNS mérést jelent, ezt kicsit pontosítani kéne.

A 36. oldalon az STR-ek definíciója eltér az általánostól, nem small tandem repeat, hanem short tandem repeat.

Kisebb pontatlanság található a VEGF-fel kapcsolatban a 37. oldaltól kezdődően, ami aztán végig a dolgozatban többször előfordul. A VEGF egyetlen génként szerepel, pedig az egy fehérje család, amelynek különböző tagjait különböző gének kódolják, pl. *VEGFA*, *VEGFB*, *VEGFC*, stb. Pontosítani kell, hogy melyik gént is vizsgálta! Ide tartozik, hogy tudományos munkákban a gének hivatalos HUGO (HUGO Gene Nomenclature Committee) nevét és írásmódját (dőlt betűk) kell használni, ami a legtöbb esetben teljesül is az értekezésben.

Az irodalmi áttekintést a célkitűzések követik. A jelölt összesen hat célt fogalmaz meg benne, melyek mindegyike módszerbeállítás. Egy alap kutatásokkal foglalkozó kutatónak első olvasásra kicsit furcsa, hogy egy MTA doktori értekezésben a kutatások céljai módszerek adaptálása, bevezetése. Az alap kutatásoknál ugyanis a módszerek beállítása csak az első lépés a kutatás végső kérdéseinek vizsgálatára. Itt azonban alkalmazott kutatásokról van szó, ahol a módszerek beállításának, adaptálásának mások a minőségi követelményei, mint az alap kutatásoknál és ebből következően nagyobb szellemi tevékenységet is igényelnek. Ráadásul, ahogy a dolgozat eredményeiből is kiderül, bizonyos beállított módszereket alap kutatási kérések vizsgálatára is felhasználásra kerültek. Azonban tanulmányozva a jelölt teljes tudományos munkásságát, cikkeit, világossá válik, hogy az nem korlátozódik módszerbeállításokra, hanem annál lényegesen kiterjedtebb. Talán érdemes lett volna kicsit több témát a dolgozat témájához csatolni, bár ez valószínűleg csak egy szubjektív vélemény.

Az anyagok és módszerek részben szakemberhez méltó, általában reprodukálható pontos leírásokat olvashatunk.

Az eredmények leírásánál pontos képet kaphatunk a különböző módszerek összehasonlításáról, beállításáról. A magzatvíz *Toxoplasma gondii* fertőzés kimutatásánál 4 PCR alapú módszert hasonlít össze. A legjobb és végül kiválasztott módszer 1 óra alatt 32 mintánál egyetlen kórokozót is képes volt kimutatni, amely komoly teljesítmény és jelentős előrelépés a korábbi módszerrel összehasonlítva. Némileg zavaró a leírásnál néhány pontatlanság. Így a módszereknél 74 várandósból 58 pozitív IgM-re 2 IgG-re, az eredményeknél 48 pozitív IgM-re, míg a megbeszélésben már csak összesen 64 várandós mintáról van szó. Nem tudom, hogy egy módszer bevezetésénél nem kell-e megadni a

módszer szenzitivitását és specificitását? Volt-e ilyen vizsgálat erre a módszerre és ha igen, mi volt az eredménye?

A 21-es triszómia kimutatásánál a 13. ábrán sajnos nem lehet megállapítani, hogy melyik a kék, lila és a bordó színű vonal, de ez később is igaz a hasonló ábrákra. Én jobbnak tartottam volna ha az SNP markerek megadásánál, azok hivatalos rs kódja is megadásra került volna. Amikor megpróbáltam a megadott kódok alapján (WIAF 899 és WIAF 2643) utánanézni az SNP-knek, csak a jelölt cikkét, illetve a markereket először leíró cikket találtam meg. Szintén hasznos információ lett volna az SNP-k populációs gyakorisága. A módszer a hagyományos kariotipizálási módszernél jelentősen gyorsabb. Szintén gyorsabb a mikroszatellita polimorfizmuson alapuló fluoreszcens PCR-nél és fragmens analízisnél. Viszont mindössze a betegek kb. 50 %-át tudta a kétféle SNP diagnosztizálni. Ezzel kapcsolatban a kérdésem, hogy minimum hány SNP vizsgálatával lehetne 100% közelébe vinni a módszer szenzitivitását? Illetve elképzelhetőnek tartja-e, hogy ennek a módszernek valamilyen változatát alkalmazzák a klinikai gyakorlatban?

A cisztikus fibrózis leggyakoribb mutációjának gyors kimutatása klinikai jelentőségű. Ebben a részben, illetve a későbbiekben többször is előfordul egy elnevezésbeli hiba. A *CFTR* génben az F508C mutáció egy fenilalanin cisztein csere és szemben a Δ F508-cal, ami a fenilalanin deléciója, az F508C-nél nem kell a Δ jel, ami a delécióra utal. Itt az ábraszámozások valószínűleg nem stimmelnek, a fragmens analízisről szóló alfejezetben, az utolsó sorban a 19. ábrára történik utalás, amely egy olvadáspont analízist mutat.

A szabad nukleinsav meghatározásnak óriási a jelentősége, hiszen megteremti a lehetőséget, hogy a terhességnél veszélyes invazív mintavétel helyett egyszerű anyai vérvétellel kapjunk a magzatról genetikai információkat. A jelölt, nagyon helyesen ezen a területen is végez kutatásokat. Az ebben a fejezetben található 21. ábrán, az X tengelyen hibás felirat található, ciklusszám helyett hőmérséklet.

A megbeszélésnél az eredmények értelmezése és a tudományos irodalomban találhatóakkal való összevetése olvasható megfelelő színvonalon. A 96. oldalon az szerepel, hogy a „VEGF” génben 30 SNP-t írtak le. Mint már előbb írtam, bár ilyen gén nincs, a dbSNP adatbázisban VEGF címszóhoz 9817 db SNP tartozott, és a jelölt által valószínűleg vizsgált *VEGFA* génben is több mint 2000.

Az új tudományos eredmények leírásánál a jelölt 14 pontban írja le eredményeit. Én ezt egy kicsit kevesebb pontban és tömörebben fogalmaztam volna meg.

A fentiekén kívül néhány kérdés a jelölthöz:

- Elképzelhetőnek tartana-e olyan T gondi detektálási módszert, amely a magzatok fertőzöttségét kevésbé invazív módon vett mintából vizsgálná?
- Mit gondol, a prenatális diagnózisban mi lesz a jövő módszere genetikai vizsgálatoknál?
- Lesz-e újszülötteknél teljes genom szekvenálás? Ha nem miért nem, ha igen, milyen negatív és pozitív következményei lehetnek?
- Használják-e a gyakorlatban a $\Delta F508$ mutációra kidolgozott gyors, PCR alapú módszert?
- Mi az előnye és hátránya az RhD magzati vércsoport PCR-rel történő meghatározásának? Használják-e a rutinban?

Összefoglalva, Nagy Bálint tudományos tevékenységét, értekezését és annak összefoglalóját megfelelőnek találom, a nyilvános vita kitűzését, továbbá a mű elfogadását ajánlom.

Budapest, 2014. november 6.

Dr. Szalai Csaba MTA doktora
SE Genetikai Sejt és Immunbiológiai Intézet
Igazgató helyettes, egyetemi tanár
Heim Pál Kórház